

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

(127)

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
1. Mai 2003 (01.05.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 03/035082 A1**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **A61K 31/713**, (74) **Anwalt: GASSNER, Wolfgang**; Nägelsbachstr. 49 A,  
C12N 15/11, 15/88 91052 Erlangen (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/11971 (81) **Bestimmungsstaaten (national)**: AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
(22) Internationales Anmeldedatum: 25. Oktober 2002 (25.10.2002) CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,  
(25) Einreichungssprache: Deutsch KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,  
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (30) Angaben zur Priorität:  
101 55 280.7 26. Oktober 2001 (26.10.2001) DE  
101 58 411.3 29. November 2001 (29.11.2001) DE  
101 60 151.4 7. Dezember 2001 (07.12.2001) DE  
PCT/EP02/00151 9. Januar 2002 (09.01.2002) EP  
PCT/EP02/00152 9. Januar 2002 (09.01.2002) EP  
102 30 996.5 9. Juli 2002 (09.07.2002) DE
- (84) **Bestimmungsstaaten (regional)**: ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,  
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,  
SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,  
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) **Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): RIBOPHARMA AG** [DE/DE]; Fritz-Hornschuch-  
Str. 9, 95326 Kulmbach (DE).
- (72) **Erfinder; und**
- (75) **Erfinder/Anmelder (nur für US): LIMMER, Stefan**  
[DE/DE]; Gutenbergstr. 9, 95512 Neudrossenfeld (DE).  
**LIMMER, Sylvia** [DE/DE]; Gutenbergstr. 9, 95512  
Neudrossenfeld (DE). **KREUTZER, Roland** [DE/DE];  
Glotzdorf 26, 95466 Weidenberg (DE). **HADWIGER,**  
**Philipp** [DE/DE]; Almstr. 5, 95448 Bayreuth (DE).
- Veröffentlicht:**  
— mit internationalem Recherchenbericht  
— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden  
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen  
eintreffen
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.*

WO 03/035082 A1

(54) **Title:** DRUG FOR INHIBITING EXPRESSION OF A TARGET GENE

(54) **Bezeichnung:** MEDIKAMENT ZUR HEMMUNG DER EXPRESSION EINES ZIELGENS

(57) **Abstract:** The invention relates to a drug for inhibiting the expression of a target gene, said drug being present in at least one administration unit which contains a double strand ribonucleic acid suitable for inhibiting, through RNA interference, the expression of a target gene, in an amount allowing a dosage of less than 5 mg per kilogram of bodyweight per day.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein Medikament zur Hemmung der Expression eines Zielgens, wobei das Medikament in mindestens einer Verabreichungseinheit vorliegt, welche eine mittels RNA-Interferenz zur Hemmung der Expression des Zielgens geeignete doppelsträngige Ribonukleinsäure in einer Menge enthält, welche eine Dosierung von höchstens 5 mg pro kg Körpergewicht und Tag ermöglicht.

**Medikament zur Hemmung der Expression eines Zielgens**

Die Erfindung betrifft ein Medikament und eine Verwendung zur  
5 Hemmung der Expression eines Zielgens.

Aus Jansen, B. et al., The Lancet, Vol. 356, 2000, S. 1728  
bis 1733 ist es bekannt, Antisinn-Oligonukleotide in Dosie-  
rungen von 0,6 bis 6,5 mg/kg und Tag Patienten zu verabrei-  
10 chen. Eine Dosierung von 0,6 mg/kg und Tag führte zu keiner  
Verminderung der Konzentration des von dem Zielgen kodierten  
Proteins. Als biologisch relevant wird eine dauerhafte Plas-  
makonzentration von über 1 mg/l erachtet. Dies kann durch ei-  
ne Dosierung des Antisinn-Oligonukleotids von etwa 2 mg/kg  
15 Körpergewicht und Tag erreicht werden. Die Therapie ist nur  
bei einem Teil der Patienten erfolgreich.

Aus der DE 101 00 586 C1 ist ein Verfahren zur Hemmung der  
Expression eines Zielgens in einer Zelle mittels RNA-  
20 Interferenz bekannt. Dabei wird ein Oligoribonukleotid mit  
doppelsträngiger Struktur in die Zelle eingeführt. Ein Strang  
der doppelsträngigen Struktur ist dabei komplementär zum  
Zielgen. Es ist nicht bekannt, wie ein solches Oligoribonu-  
kleotid in vivo zur Hemmung eines Zielgens eingesetzt werden  
25 kann.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Nachteile nach  
dem Stand der Technik zu beseitigen. Es soll insbesondere ein  
wirksames Medikament und eine Verwendung zur Hemmung der Ex-  
30 pression eines Zielgens bereitgestellt werden.

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1 und 16  
gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den  
Merkmalen der Ansprüche 2 bis 15 und 17 bis 30.

35

Erfindungsgemäß ist ein Medikament zur Hemmung der Expression eines Zielgens vorgesehen, wobei das Medikament in mindestens einer Verabreichungseinheit vorliegt, welche eine zur Hemmung der Expression des Zielgens mittels RNA-Interferenz geeignete doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) enthält. Die dsRNA kann dabei in der Verabreichungseinheit in einer Menge enthalten sein, welche eine Dosierung von höchstens 5 mg pro kg Körpergewicht und Tag ermöglicht. Eine dsRNA liegt vor, wenn die aus einem oder zwei Ribonukleinsäure-Strängen bestehende Ribonukleinsäure eine doppelsträngige Struktur aufweist. Nicht alle Nukleotide der dsRNA müssen kanonische Watson-Crick-Basenpaarungen aufweisen. Insbesondere einzelne nicht komplementäre Basenpaare beeinträchtigen die Wirksamkeit kaum oder gar nicht. Die maximal mögliche Zahl der Basenpaare ist die Zahl der Nukleotide in dem kürzesten in der dsRNA enthaltenen Strang. Das Zielgen kann ein Onkogen, Cytokin-Gen, Idiotyp-Protein-Gen (Id-Protein-Gen), Prionen, Gen zur Expression von Angiogenese induzierenden Molekülen, von Adhäsions-Molekülen und Zelloberflächenrezeptoren, Gen von Proteinen, die an metastasierenden und/oder invasiven Prozessen beteiligt sind, Gen von Proteinasen sowie Apoptose- und Zellzyklus-regulierenden Molekülen, Gen zur Expression des EGF-Rezeptors, das Multidrug-Resistance 1-Gen (MDR1-Gen), ein in pathogenen Organismen, vorzugsweise Plasmodien, exprimiertes Gen oder ein Bestandteil eines, insbesondere humanpathogenen, Virus sein.

Die Verabreichungseinheit kann für eine einmalige Verabreichung bzw. Einnahme pro Tag konzipiert sein. Dann ist die gesamte Tagesdosis in einer Verabreichungseinheit enthalten. Ist die Verabreichungseinheit für eine mehrmalige Verabreichung bzw. Einnahme pro Tag konzipiert, so ist die dsRNA darin in einer entsprechend geringeren das Erreichen der Tagesdosis ermöglichenden Menge enthalten. Die Verabreichungseinheit kann auch für eine einzige Verabreichung bzw. Einnahme

für mehrere Tage konzipiert sein, z. B. indem die dsRNA über mehrere Tage freigesetzt wird. Die Verabreichungseinheit enthält dann ein entsprechend Mehrfaches der Tagesdosis.

- 5 Das Medikament enthält die dsRNA in einer zur Hemmung der Expression des Zielgens in einem damit zu behandelnden Organismus ausreichenden Menge. Das Medikament kann auch so konzipiert sein, dass mehrere Einheiten des Medikaments zusammen die ausreichende Menge in der Summe enthalten. Die ausreichende Menge hängt auch von der pharmazeutischen Formulierung  
10 des Medikaments ab.

Überraschenderweise hat sich gezeigt, dass die dsRNA in vivo in der niedrigen Dosierung von höchstens 5 mg pro kg Körpergewicht und Tag in einem Säugetier oder Menschen hochwirksam  
15 ist. Das ist insbesondere auch deshalb überraschend, weil es in Säugetieren und Menschen Mechanismen gibt, welche doppelsträngige Nukleinsäuren als körperfremd erkennen und abbauen.

- 20 Vorzugsweise enthält die Verabreichungseinheit die dsRNA in einer Menge, welche eine Dosierung von höchstens 2,5 mg, insbesondere höchstens 200 µg, bevorzugt höchstens 100 µg, besonders bevorzugt höchstens 50 µg, insbesondere höchstens 25 µg, pro kg Körpergewicht und Tag ermöglicht. Es hat es sich  
25 nämlich gezeigt, dass die dsRNA sogar in dieser noch niedrigeren Dosierung eine ausgezeichnete Effektivität in der Hemmung der Expression des Zielgens aufweist.

- Bei einer Ausgestaltung ist die dsRNA in dem Medikament in  
30 einer Zubereitung enthalten, welche, insbesondere ausschließlich, aus einem physiologisch verträglichen Lösungsmittel und der darin gelösten dsRNA besteht. Bei dem Lösungsmittel handelt es sich im Allgemeinen um einen Puffer. Darin können Zusätze enthalten sein, z. B. solche, welche den Puffer physiologisch verträglicher oder haltbar machen. "Ausschließlich"  
35

bedeutet hier, dass keine Stoffe enthalten sind, welche die Aufnahme der dsRNA in das Zielgen exprimierende Zellen bewirken oder vermitteln. Solche Stoffe sind z. B. micellare Strukturen, insbesondere Liposomen, oder Kapside. Überraschenderweise hat sich gezeigt, dass eine lediglich in einem physiologisch verträglichen Lösungsmittel gelöste und verabreichte dsRNA von das Zielgen enthaltenen Zellen aufgenommen wird und die Expression des Zielgens hemmt. Obwohl es in der Zellkultur erforderlich ist, dsRNA durch Mikroinjektion, Lipofektion, Viren, Viroide, Kapside, Kapside oder sonstige Hilfsmittel in die Zellen einzuschleusen, ist das in vivo überraschenderweise nicht erforderlich. Das Medikament kann auch ausschließlich aus der genannten Zubereitung bestehen. Ein solches Medikament ist dann beispielsweise zu intravenösen Applikationen geeignet.

Bevorzugt ist das Lösungsmittel eine physiologische Kochsalzlösung oder ein physiologisch verträglicher Puffer, insbesondere eine phosphatgepufferte Salzlösung.

Die dsRNA kann in dem Medikament von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Kapsid, einem Kapsoid oder einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel umschlossen oder an einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel gebunden vorliegen. Eine micellare Struktur, ein Kapsid, ein Kapsoid oder eine polymere Nano- oder Mikrokapsel kann die Aufnahme der dsRNA in Zellen erleichtern. Die dsRNA kann von einem viralen natürlichen oder einem auf chemischem oder enzymatischem Wege hergestellten künstlichen Kapsid oder einer davon abgeleiteten Struktur eingeschlossen sein. Die polymere Nano- oder Mikrokapsel besteht aus mindestens einem biologisch abbaubaren Polymer, z.B. Polybutylcyanoacrylat. Die polymere Nano- oder Mikrokapsel kann darin enthaltene oder daran gebundene dsRNA im Körper transportieren und freisetzen.

Die dsRNA kann oral, mittels Inhalation, Infusion oder Injektion, insbesondere intravenöser, intraperitonealer oder intratumoraler Infusion oder Injektion, verabreicht werden. Bei einer Ausgestaltung weist das Medikament daher eine Zubereitung auf, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion oder Injektion, insbesondere zur intravenösen, intraperitonealen oder intratumoralen Infusion oder Injektion, geeignet ist. Wie eine solche Zubereitung hergestellt werden kann, ist aus der Pharmazie bekannt. Eine zur Inhalation, Infusion oder Injektion geeignete Zubereitung kann im einfachsten Fall aus einem physiologisch verträglichen Lösungsmittel, vorzugsweise einer physiologischen Kochsalzlösung oder einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, und der dsRNA bestehen.

Vorzugsweise weist ein Strang S1 der dsRNA einen zum Zielgen zumindest abschnittsweise komplementären, insbesondere aus weniger als 25 aufeinander folgenden Nukleotiden bestehenden, Bereich auf. Unter dem "Zielgen" wird im Allgemeinen der DNA-Strang der doppelsträngigen für ein Protein kodierenden DNA verstanden, welcher komplementär zu einem bei der Transkription als Matrize dienenden DNA-Strang einschließlich aller transkribierten Bereiche ist. Bei dem Zielgen handelt es sich also im Allgemeinen um den Sinn-Strang. Der Strang S1 kann somit komplementär zu einem bei der Expression des Zielgens gebildeten RNA-Transkript oder dessen Prozessierungsprodukt, wie z.B. einer mRNA, sein. Bei dem Zielgen kann es sich aber auch um einen Teil eines viralen Genoms handeln. Das virale Genom kann auch das Genom eines (+)-Strang-RNA-Virus, insbesondere eines Hepatitis C-Virus, sein.

Der komplementäre Bereich der dsRNA kann 19 bis 24, bevorzugt 20 bis 24, besonders bevorzugt 21 bis 23, insbesondere 22 oder 23, Nukleotide aufweisen. Eine dsRNA mit dieser Struktur ist besonders effizient in der Inhibition des Zielgens. Der

Strang S1 der dsRNA kann weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, insbesondere 23, Nukleotide aufweisen. Die Zahl dieser Nukleotide ist zugleich die Zahl der in der dsRNA maximal möglichen Basenpaare. Eine  
5 solche dsRNA ist intrazellulär besonders beständig.

Als besonders vorteilhaft hat es sich erwiesen, wenn zumindest ein Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang auf-  
10 weist. Eine solche dsRNA weist gegenüber einer dsRNA ohne einzelsträngige Überhänge an mindestens einem Ende eine bessere Wirksamkeit bei der Hemmung der Expression des Zielgens auf. Ein Ende ist dabei ein Bereich der dsRNA, in welchem ein 5'- und ein 3'-Strangende vorliegen. Eine nur aus dem Strang  
15 S1 bestehende dsRNA weist demnach eine Schleifenstruktur und nur ein Ende auf. Eine aus dem Strang S1 und einem Strang S2 gebildete dsRNA weist zwei Enden auf. Ein Ende wird dabei jeweils von einem auf dem Strang S1 und einem auf dem Strang S2 liegenden Strangende gebildet.

20 Vorzugsweise befindet sich der einzelsträngige Überhang am 3'-Ende des Strangs S1. Diese Lokalisation des einzelsträngigen Überhangs führt zu einer weiteren Steigerung der Effizienz des Medikaments. In einem Ausführungsbeispiel weist die  
25 dsRNA nur an einem, insbesondere dem am 3'-Ende des Strangs S1 gelegenen, Ende einen einzelsträngigen Überhang auf. Das andere Ende ist bei einer zwei Enden aufweisenden dsRNA glatt, d.h. ohne Überhänge, ausgebildet. Überraschenderweise  
30 hat es sich gezeigt, dass zur Verstärkung der Interferenz-Wirkung der dsRNA ein Überhang an einem Ende der dsRNA ausreichend ist, ohne dabei die Stabilität in einem solchen Maße zu erniedrigen wie durch zwei Überhänge. Eine dsRNA mit nur einem Überhang hat sich sowohl in verschiedenen Zellkulturmedien als auch in Blut, Serum und Zellen als hinreichend be-  
35 ständig und besonders Wirksam erwiesen. Die Hemmung der Ex-



pression ist besonders effektiv, wenn sich der Überhang am 3'-Ende des Strangs S1 befindet. Es ist daher insbesondere bei einer dsRNA mit einem oder zwei glatten Ende/n ausreichend, wenn die Verabreichungseinheit die dsRNA in einer Menge enthält, welche eine Dosierung von höchstens 100 µg, bevorzugt höchstens 50 µg, insbesondere höchstens 25 µg, pro Tag und kg Körpergewicht ermöglicht.

Vorzugsweise weist die dsRNA neben dem Strang S1 einen Strang S2 auf, d.h. sie ist aus zwei Einzelsträngen gebildet. Besonders wirksam ist das Medikament, wenn der Strang S1 (Antisinn-Strang) eine Länge von 23 Nukleotiden, der Strang S2 eine Länge von 21 Nukleotiden und das 3'-Ende des Strangs S1 einen aus zwei Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist. Das am 5'-Ende des Strangs S1 gelegene Ende der dsRNA ist dabei glatt ausgebildet. Der Strang S1 kann zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär sein.

Erfindungsgemäß ist weiterhin die Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure in einer Dosierung von höchstens 5 mg pro kg Körpergewicht und Tag zur Hemmung der Expression eines Zielgens mittels RNA-Interferenz in einem Säugetier oder Menschen vorgesehen.

Wegen der vorteilhaften Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Verwendung wird auf die vorangegangenen Ausführungen verwiesen.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand der Zeichnungen beispielhaft erläutert. Als Abkürzung der Konzentrationsangabe "mol/l" wird dabei "M" verwendet. Es zeigen:

Fig. 1 GFP-spezifische Immunoperoxidase-Färbung an Nieren-Paraffinschnitten transgener GFP-Mäuse,

- Fig. 2      GFP-spezifische Immunoperoxidase-Färbung an Herz-  
Paraffinschnitten transgener GFP-Mäuse,
- 5      Fig. 3      GFP-spezifische Immunoperoxidase-Färbung an Pankre-  
as-Paraffinschnitten transgener GFP-Mäuse,
- Fig. 4      Western-Blot-Analyse der GFP-Expression im Plasma,
- 10      Fig. 5      Western-Blot-Analyse der GFP-Expression in der Nie-  
re,
- Fig. 6      Western-Blot-Analyse der GFP-Expression im Herz,
- 15      Fig. 7      Prozentuale GFP-Expression (FACS-Analyse) im Blut  
GFP-transgener Mäuse nach Behandlung mit spezifi-  
scher (GFP-Gruppe) und unspezifischer (Kontroll-  
gruppe) dsRNA,
- 20      Fig. 8      Darstellung der GFP-Expression (FACS-Analyse) im  
Blut der Einzeltiere nach Behandlung mit spezifi-  
scher (GFP-Gruppe) und unspezifischer (Kontroll-  
gruppe) dsRNA,
- 25      Fig. 9      Auswertung einer FACS-Analyse der exprimierten  
Oberflächenmarker-Proteine CD11b, CD3, CD4, CD8a  
und CD19 und
- 30      Fig. 10      Western Blot-Analyse der GFP-Expression im Blut der  
mit spezifischer dsRNA behandelten Tiere 4-7 (GFP-  
Gruppe, 4 Spuren links) und der mit unspezifischer  
dsRNA behandelten Tiere 3-6 (Kontrollgruppe, 4 Spu-  
ren rechts).

Die eingesetzten doppelsträngigen Oligoribonukleotide weisen folgende Sequenzen auf:

Name	Sequenz-proto-koll-Nr.	dsRNA-Sequenz	Nukleotidanzahl [Überhang am 3'-Ende von S1 - doppelsträngiger Bereich - Überhang am 3'-Ende von S2]
S1	1	(S2) 5'- CCACAUGAAGCAGCACGACUUC -3'	0-22-0
	2	(S1) 3'- GGUGUACUUCGUCGUGCUGAAG -5'	
S7	3	(S2) 5'- CCACAUGAAGCAGCACGACUU-3'	2-19-2
	4	(S1) 3'- CUGGUGUACUUCGUCGUGCUG -5'	
K1	5	(S2) 5'- ACAGGAUGAGGAUCGUUUCGCA -3'	0-22-0
	6	(S1) 3'- UGUCCUACUCCUAGCAAAGCGU -5'	
K3	7	(S2) 5'- GAUGAGGAUCGUUUCGCAUGA -3'	2-19-2
	8	(S1) 3'-UCCUACUCCUAGCAAAGCGUA -5'	
K4	9	(S2) 5'- GAUGAGGAUCGUUUCGCAUGA -3'	2-21-0
	10	(S1) 3'-UCCUACUCCUAGCAAAGCGUACU -5'	
S7/S11	11	(S2) 5'- CCACAUGAAGCAGCACGACUU-3'	2-21-0
	12	(S1) 3'- CUGGUGUACUUCGUCGUGCUGAA-5'	

- 5 Es wurde "GFP-Labormäusen", die das Grün-fluoreszierende Protein (GFP) in allen Proteinbiosynthese betreibenden Zellen exprimieren, doppelsträngige RNA (dsRNA), die aus der GFP-Sequenz abgeleitet wurde, bzw. unspezifische dsRNA intravenös in die Schwanzvene injiziert. Die unspezifische dsRNA hat weder zum GFP-Gen noch zu einem im Menschen oder der Maus vorkommenden Gen eine Homologie. Am Versuchsende wurden die Tiere getötet und die GFP-Expression in Gewebeschnitten und im Plasma analysiert.

#### 15 Versuchsprotokoll:

##### Synthese der dsRNA:

- Mittels eines RNA-Synthesizers (Typ Expedite 8909, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) und herkömmlicher chemischer Verfahren wurden die aus dem Sequenzprotokoll ersichtlichen RNA-Einzelstränge und die zu ihnen komplementären RNA-Einzelstränge synthetisiert. Anschließend erfolgte die

Reinigung der rohen Syntheseprodukte mit Hilfe der HPLC. Als Säulen wurden NucleoPac PA-100, 9x250 mm der Fa. Dionex GmbH, Am Wörtzgarten 10, 65510 Idstein, Deutschland, verwendet; eingesetzter Niedersalzsalt-Puffer: 20 mM Tris, 10 mM NaClO<sub>4</sub>, pH 6,8, 10% Acetonitril; eingesetzter Hochsalz-Puffer 20 mM Tris, 400 mM NaClO<sub>4</sub>, pH 6,8, 10% Acetonitril. Der Fluss betrug 3 ml/Minute. Die Hybridisierung der Einzelstränge zum Doppelstrang erfolgte durch Erhitzen des stöchiometrischen Gemischs der Einzelstränge in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,8, 100 mM NaCl, auf 80-90°C und nachfolgendes langsames Abkühlen über 6 Stunden auf Raumtemperatur.

#### Versuchstierhaltung und Versuchsdurchführung:

Es wurde der transgene Labormausstamm TgN(GFPU)5Nagy (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) verwendet, der GFP (mit einem beta-Aktin-Promotor und einem CMV intermediate early enhancer) in allen bisher untersuchten Zellen exprimiert (Hadjantonakis AK et al., 1993, Mech. Dev. 76: 79-90; Hadjantonakis AK et al., 1998 Nature Genetics 19: 220-222). GFP-transgene Mäuse lassen sich eindeutig anhand der Fluoreszenz (mit einer UV-Handlampe) von den entsprechenden Wildtypen (WT) unterscheiden. Für die Versuche wurden GFP-heterozygote Tiere verwendet. Diese wurden gezüchtet, indem jeweils ein entsprechendes WT-Tier mit einem heterozygoten GFP-Tier verpaart wurde.

Die Versuchsdurchführung erfolgte gemäß den deutschen Tierenschutzbestimmungen. Die Tiere wurden unter kontrollierten Umweltbedingungen in Gruppen von 3-5 Tieren in Typ III Makrolon-Käfigen der Fa. Ehret, Emmendingen, Deutschland bei einer konstanten Temperatur von 22°C und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 h gehalten. Als Sägemehleinstreu wurde Weichholzgranulat 8/15 der Fa. Altromin, Lage, Deutschland verwendet. Die Tiere erhielten Leitungswasser und Standardfutter Altromin 1324 pelletiert der Fa. Altromin ad libidum.

Erster in vivo-Versuch:

Für die Versuchsdurchführung wurden die heterozygoten GFP-Tiere zu je 3 Tieren gruppenweise in Käfigen wie oben beschrieben gehalten. Die Injektionen der dsRNA-Lösung erfolgten intravenös (i.v.) in die Schwanzvene im 12 h-Turnus (zwischen 5<sup>30</sup> und 7<sup>00</sup> sowie zwischen 17<sup>30</sup> und 19<sup>00</sup> Uhr) über 5 Tage hinweg. Das Injektionsvolumen betrug 60 µl pro 10 g Körpergewicht und die Dosis betrug 2,5 mg dsRNA bzw. 50 µg pro kg Körpergewicht. Die Einteilung in die Gruppen war wie folgt:

- |    |           |   |
|----|-----------|---|
|    | Gruppe A: | PBS (phosphate buffered saline) je 60 µl pro 10 g Körpergewicht,  |
| 15 | Gruppe B: | 2,5 mg pro kg Körpergewicht einer unspezifischen Kontroll-dsRNA (K1-Kontrolle mit glatten Enden und einem Doppelstrangbereich von 22 Nukleotidpaaren),  |
| 20 | Gruppe C: | 2,5 mg pro kg Körpergewicht einer weiteren unspezifischen Kontroll-dsRNA (K3-Kontrolle mit 2-Nukleotid(nt)-Überhängen an beiden 3'-Enden und einem Doppelstrangbereich von 19 Nukleotidpaaren),           |
| 25 | Gruppe D: | 2,5 mg pro kg Körpergewicht dsRNA (spezifisch gegen GFP gerichtet, im Weiteren als S1 bezeichnet, mit glatten Enden und einem Doppelstrangbereich von 22 Nukleotidpaaren),                                |
| 30 | Gruppe E: | 2,5 mg dsRNA pro kg Körpergewicht (spezifisch gegen GFP gerichtet, im Weiteren als S7 bezeichnet, mit 2nt-Überhängen an den 3'-Enden beider Stränge und einem Doppelstrangbereich von 19 Nukleotidpaaren) |
| 35 |           |   |

Gruppe F: 50 µg S1-dsRNA pro kg Körpergewicht (also 1/50 der Dosis der Gruppe D).

- 5 Nach der letzten Injektion von insgesamt 10 Injektionen wurden die Tiere nach 14-20 h getötet und Organe und Blut wie beschrieben entnommen.

Organentnahme:

- 10 Sofort nach dem Töten der Tiere durch CO<sub>2</sub>-Inhalation wurden Blut und verschiedene Organe entnommen (Thymus, Lunge, Herz, Milz, Magen, Darm, Pankreas, Gehirn, Niere und Leber). Die Organe wurden kurz in kaltem, sterilem PBS gespült und mit einem sterilen Skalpell zerteilt. Ein Teil wurde für immu-  
15 stochemische Färbungen in Methyl Carnoys (MC, 60% Methanol, 30% Chloroform, 10% Eisessig) für 24 h fixiert, ein Teil für Gefrierschnitte und für Proteinisolierungen sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert und ein weiterer, kleinerer Teil wurde für RNA-Isolierungen in RNA-  
20 easy-Protect (QIAGEN GmbH, Max-Volmer-Straße 4, 40724 Hilden) bei -80°C eingefroren. Das Blut wurde sofort nach der Entnahme für 30 min auf Eis gehalten, gemixt, 5 min bei 2000 Umdrehungen pro Minute (Mini spin, Eppendorf AG, Barkhausenweg 1, 22331 Hamburg, Deutschland) zentrifugiert, der Überstand ab-  
25 genommen und bei -80°C gelagert (hier als Plasma bezeichnet).

Prozessieren der Biopsien:

- Nach 24 h Fixierung der Gewebe in MC wurden die Gewebestücke in einer aufsteigenden Alkoholreihe bei RT (Raumtemperatur)  
30 dehydriert: je 40 min 70% Methanol, 80% Methanol, 2 x 96% Methanol und 3 x 100% Isopropanol. Danach wurden die Gewebe in 100% Isopropanol auf 60°C im Brutschrank erwärmt, nachfolgend für 1 h in einem Isopropanol/Paraffin-Gemisch bei 60°C und 3 x für 2 h in Paraffin inkubiert und sodann in Paraffin  
35 eingebettet. Für Immunperoxidase-Färbungen wurden mit einem

Rotationsmikrotom (Leica Microsystems Nussloch GmbH, Heidelberg Str. 17 - 19, D-69226 Nussloch, Deutschland) Gewebeschnitte von 3 µm Schnittdicke angefertigt, auf Objektträger (Superfrost, Fa. Vogel GmbH & Co. KG, Medizinische Technik und Elektronik, Marburger Straße 81, 35396 Gießen, Deutschland) aufgezogen und für 30 min bei 60°C im Brutschrank inkubiert.

Immunperoxidase-Färbung gegen GFP:

- 10 Die Schnitte wurden 3 x 5 min in Xylol deparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe (3 x 3 min 100% Ethanol, 2 x 2 min 95% Ethanol) rehydriert und danach 20 min in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Methanol zum Blocken endogener Peroxidasen inkubiert. Alle Inkubationsschritte wurden im Folgenden in einer feuchten Kam-
- 15 mer durchgeführt. Nach 3 x 3 min Waschen mit PBS wurde mit einem ersten Antikörper (Ziege anti-GFP-Antikörper, sc-5384, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Bergheimer Str. 89-2, 69115 Heidelberg, Deutschland) 1:500 in 1% BSA/PBS über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Inkubation mit dem biotinylierten Sekun-
- 20 därantikörper (Esel anti-Ziegen IgG; Santa Cruz Biotechnology; 1:2000 Verdünnung) erfolgte für 30 min bei RT, danach wurde für 30 min mit Avidin D Peroxidase (1:2000-Verdünnung, Vector Laboratories, 30 Ingold Road, Burlingame, CA 94010, USA) inkubiert. Nach jeder Antikörperinkubation wurden die
- 25 Schnitte 3 x 3 min in PBS gewaschen und Pufferreste mit Zellstoff von den Schnitten entfernt. Alle Antikörper wurden in 1% Rinderserumalbumin (BSA)/PBS verdünnt. Die Färbung mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) wurde mit dem DAB Substrat Kit (Vector Laboratories) nach Herstellerangaben durchgeführt.
- 30 Als nukleäre Gegenfärbung wurde Hämatoxylin III nach Gill (Merck KGaA, Frankfurter Str. 250, D-64293 Darmstadt) verwendet. Nach der Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und 3 x 5 min Xylol wurden die Schnitte mit Entellan (Merck) eingedeckt. Die mikroskopische Auswertung der Färbung
- 35 erfolgte mit dem IX50 Mikroskop der Fa. OLYMPUS Optical

Co.(Europa) GmbH, Wendenstr. 14-18, D-20097 Hamburg, Deutschland ausgestattet mit einer CCD-Camera (Hamamatsu Photonics K.K., Systems Division, 812 Joko-cho Hamamatsu City, 431-3196 Japan).

5

Proteinisolierung aus Gewebestücken:

Zu den noch gefrorenen Gewebestücken wurden jeweils 800 µl Isolierungspuffer (50 mM HEPES, pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 2,5 mM EGTA; 10% Glycerol; 0,1% Tween; 1 mM DTT; 10 mM β-Glycerol-Phosphat; 1 mM NaF; 0,1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> mit einer Protease-Inhibitor-Tablette "Complete" der Fa. Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Sandhofer Str. 116, 68305 Mannheim) zugegeben und 2 x 30 Sekunden mit einem Ultraturrax (DIAX 900, Dispergierwerkzeug 6G, HEIDOLPH Instruments GmbH & Co. KG, Walpersdorfer Straße 12, D-91126 Schwabach) homogenisiert, dazwischen auf Eis abgekühlt. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis wurde gemischt und für 20 Minuten bei 10000 x g, 4°C, zentrifugiert (3K30, SIGMA Laborzentrifugen GmbH, An der Unteren Söse 50, D - 37507 Osterode am Harz). Der Überstand wurde erneut 10 Minuten auf Eis inkubiert, gemischt und 20 Minuten bei 15000 x g, 4°C, zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford, 1976, modifiziert nach Zor & Selinger, 1996, mit dem Roti-Nanoquant-System der Fa. Carl Roth GmbH & Co., Schoemperlenstr. 1-5, 76185 Karlsruhe, Deutschland nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Protein-Eichgerade wurde BSA (bovines Serumalbumin) in Konzentrationen von 10 bis 100 µg/ml eingesetzt.

SDS-Gelelektrophorese:

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in einer Multigel-Long Elektrophoresekammer der Fa. Whatman Biometra GmbH, Rudolf-Wissell-Str. 30, 37079 Göttingen, Deutschland mittels einer denaturierenden, diskontinuierlichen 15% SDS-PAGE (Polyacrylamid Gelelektrophorese) nach Lämmli (Na-



ture 277: 680-685, 1970). Dazu wurde zunächst ein Trenngel mit 1,5 mm Dicke gegossen: 7,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%, 0,9%), 3,8 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,4, 150  $\mu$ l 10% SDS, 3,3 ml Aqua bidest., 250  $\mu$ l Ammoniumpersulfat (10%), 9  $\mu$ l TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin) und bis zum Auspolymerisieren mit 0,1% SDS überschichtet. Danach wurde das Sammelgel gegossen: 0,83  $\mu$ l Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0,9%), 630  $\mu$ l 1 M Tris/HCl, pH 6,8, 3,4 ml Aqua bidest., 50  $\mu$ l 10% SDS, 50  $\mu$ l 10% Ammoniumpersulfat, 5  $\mu$ l TEMED.

10

Vor dem Auftrag auf das Gel wurden die Proteine mit einer entsprechenden Menge an 4-fach Probenpuffer (200 mM Tris, pH 6,8, 4% SDS, 100 mM DTT (Dithiotreitol), 0,02% Bromphenolblau, 20% Glycerin) versetzt, für 5 min im Heizblock bei 100°C denaturiert, nach dem Abkühlen auf Eis kurz abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Pro Bahn wurde die gleichen Plasma- bzw. Proteinmengen eingesetzt (je 3  $\mu$ l Plasma bzw. 25  $\mu$ g Gesamtprotein). Die Elektrophorese erfolgte wassergekühlt bei RT und konstant 50 V. Als Längenstandard wurde der Proteingelmarker Kaleidoscope Prestained Standard der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH, Heidemannstraße 164, 80939 München, Deutschland verwendet.

15

20

#### Western Blot und Immundetektion:

Der Transfer der Proteine vom SDS-PAGE auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran (Hybond-P, Amersham Biosciences Europe GmbH, Munzinger Str. 9, D-79111 Freiburg, Deutschland) erfolgte im semi-dry Verfahren nach Kyhse-Anderson (J. Biochem. Biophys. Methods 10: 203-210, 1984) bei RT und einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA/cm<sup>2</sup> für 1,5 h. Als Transferpuffer wurde ein Tris/Glycin-Puffer eingesetzt (39 mM Glycin, 46 mM Tris, 0,1 % SDS und 20% Methanol). Zum Überprüfen des elektrophoretischen Transfers wurden sowohl die Gele nach dem Blotting als auch die Blotmembranen nach der Immundetektion mit Coomassie (0,1% Coomassie G250, 45% Methanol, 10% Eis-

25

30

35

sig) gefärbt. Zum Absättigen unspezifischer Bindungen wurde die Blotmembran nach dem Transfer in 1% Magermilchpulver/PBS für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde je dreimal für 3 min mit 0,1% Tween-20/PBS gewaschen. Alle nachfolgenden Antikörperinkubationen und Waschschr

5 perinkubationen und Waschschr

20 20/PBS. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (Ziege anti-GFP-Antikörper, sc-5384, Santa Cruz Biotechnology) in einer Verdünnung von 1:1000 erfolgte für 1 h bei RT. Danach wurde 3 x 5 min gewaschen und für 1 h bei RT mit einem Sekundärantikörper (Esel anti-Ziege IgG, mit Meerrettich-Peroxidase markiert, Santa Cruz Biotechnology) in einer Verdünnung von 1:10000 inkubiert. Die Detektion erfolgte mit dem ECL-System der Fa. Amersham nach den Angaben des Herstellers.

15 In den Fig. 1 bis 3 ist die Inhibition der GFP-Expression nach intravenöser Injektion von spezifisch gegen GFP gerichteter dsRNA mittels Immunperoxidase-Färbungen von GFP an 3 µm Paraffinschnitten dargestellt. Im Versuchsverlauf wurde gegen GFP gerichtete dsRNA mit einem doppelsträngigen Bereich von

20 22 Nukleotid-(nt)paaren ohne Überhänge an den 3'-Enden (D) und die entsprechende unspezifische Kontroll-dsRNA (B) sowie spezifisch gegen GFP gerichtete dsRNA mit einem 19 Nukleotidpaare umfassenden Doppelstrangbereich mit 2nt-Überhängen an den 3'-Enden (E) und die entsprechende unspezifische Kontroll-dsRNA (C) im 12 Stunden-Turnus über 5 Tage hinweg appliziert. (F) erhielt 1/50 der Dosis von Gruppe D. Als weitere Kontrolle wurden Tiere ohne dsRNA-Gabe (A) bzw. WT-Tiere untersucht. Die Fig. 1 zeigt die Inhibition der GFP-Expression in Nierenschnitten, Fig. 2 in Herz- und Fig. 3 in Pankreasgewebe. In den Fig. 4 bis 6 sind Western Blot-Analysen der GFP-Expression in Plasma und Geweben dargestellt. In der

30 Fig. 4 ist die Inhibition der GFP-Expression im Plasma, in Fig. 5 in der Niere und in Fig. 6 im Herz gezeigt. In Fig. 6 sind Gesamtproteinisolate aus verschiedenen Tieren aufgetragen. Es wurden jeweils gleiche Gesamtproteinmengen pro Bahn

35

aufgetragen. In den Tieren, denen unspezifische Kontroll-dsRNA verabreicht wurde (Tiere der Gruppen B und C), ist die GFP-Expression gegenüber Tieren, die keinerlei dsRNA erhielten, nicht reduziert. Tiere, die spezifisch gegen GFP gerichtete dsRNA mit 2nt-Überhängen an den 3'-Enden beider Stränge und einen 19 Nukleotidpaare umfassenden Doppelstrangbereich erhielten, zeigten eine signifikant inhibierte GFP-Expression in den untersuchten Geweben (Herz, Niere, Pankreas und Blut), verglichen mit unbehandelten Tieren (Fig. 1 bis 6). Bei den Tieren der Gruppen D und F, denen spezifisch gegen GFP gerichtete dsRNA mit glatten Enden und einem 22 Nukleotidpaare umfassenden Doppelstrangbereich appliziert wurde, zeigten nur jene Tiere, die die dsRNA in einer Dosis von 50 µg/kg Körpergewicht pro Tag erhielten, eine spezifische Inhibition der GFP-Expression, die allerdings weniger deutlich ausgeprägt war als die der Tiere in Gruppe E.

Die zusammenfassende Auswertung von GFP-Inhibition in den Gewebeschnitten und im Western Blot ergibt, dass die Inhibition der GFP-Expression im Blut und in der Niere am stärksten ist (Fig. 1, 4 und 5).

#### Zweiter in vivo-Versuch:

In einer Zusatzstudie wurde untersucht, ob sich die im ersten Versuch als wirksam erwiesene in vivo applizierte Dosierung von 5 mg/kg Körpergewicht (KG) und Tag weiter reduzieren lässt. Dazu wurde für die intravenöse Injektion in die Schwanzvene der GFP-transgenen Mäuse die 200-fach geringere Dosierung von 25 µg/kg KG und Tag gewählt. Es wurde das aus der GFP-Sequenz abgeleitete GFP-spezifische dsRNA-Konstrukt S7/S11 verwendet, das sich in in vitro-Transkriptionen als besonders effektiv erwiesen hatte. Als unspezifische Kontroll-dsRNA wurde K4 verwendet. K4 weist die gleiche Konstruktion wie S7/S11 auf (dsRNA mit 21 Basenpaarungen und einem 2nt-Überhang am 3'-Ende des Antisinnstrangs S1). Die Se-

quenz von K4 ist aus dem 5'-Ende des Neomycin-Resistenzgens abgeleitet.

Um die Wirksamkeit der GFP-spezifischen dsRNA zu untersuchen, wurde nach Versuchsende im Blut der prozentuale Anteil der GFP-positiven Lymphozyten mittels FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting) ermittelt, sowie die GFP-Expression im Gesamtblut durch Western Blot-Analyse untersucht.

Während der Versuchsdurchführung wurden die heterozygoten GFP-Versuchstier zu je 2 bis 3 Tieren gruppenweise in Käfigen wie oben beschrieben gehalten. Die Injektionen erfolgten in Impfkäfigen ohne Betäubung einmal täglich, morgens, intravenös (i.v.) in die Schwanzvene über einen Zeitraum von 21 Tagen hinweg. Das Injektionsvolumen betrug 60 µl pro 10 g Körpergewicht und die Dosis betrug 25 µg dsRNA (GFP-spezifische dsRNA) bzw. 250 µg dsRNA (unspezifische Kontroll-dsRNA K4) pro kg Körpergewicht. Die Versuchstiere wurden in zwei Gruppen eingeteilt:

Die GFP-Gruppe bestand aus 7 Tieren, die 25 µg/kg Körpergewicht der GFP-spezifischen dsRNA S7/S11 erhielten. Die Kontrollgruppe, bestehend aus 6 Tieren, erhielt die unspezifische Kontroll-dsRNA K4 in einer Konzentration von 250 µg/kg Körpergewicht. Nach der letzten Injektion am Tag 21 wurden die Tiere genau 24 Stunden später, am Tag 22, mit CO<sub>2</sub> getötet, der Bauchraum geöffnet und mittels Herzpunktion mit einer Kanüle sofort Blut entnommen. Ca. 100 µl Vollblut wurden ohne weitere Behandlung für Western Blot-Analysen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der größte Teil des Blutes wurde zur Inhibition der Blutgerinnung 1:1 mit 100 mM Natriumcitrat versetzt, vorsichtig gemischt, und bis zur FACS-Analyse bei RT im Dunkeln aufbewahrt.

## FACS-Analyse:

Vor der FACS-Analyse wurde eine Erythrolyse durchgeführt, die automatisiert mit dem Immunoprep Reagenz Kit der Fa. Beckman  
5 Coulter GmbH - Diagnostics, Siemensstrasse 1, D-85716, Unterschleissheim, Deutschland am Coulter® Q-Prep™ (Fa. Beckman Coulter GmbH) nach Herstellerprotokoll vorgenommen wurde. Dazu wurden je 100 µl des mit Natriumcitrat versetzten Bluts, die in ein 5 ml-FACS-Röhrchen mit Rundboden pipettiert wurden,  
10 verwendet. Die Bestimmung der GFP-exprimierenden Zellen erfolgte am Durchflusscytometer Coulter® EPICS XL™ der Fa. Beckman Coulter GmbH.

Zusätzlich wurde mittels direkter Färbung und anschließender  
15 FACS-Analyse eine quantitative Analyse der B- und T-Zellen sowie der Granulozyten/ Makrophagen/ Monozyten vorgenommen. Folgende Phycoerythrin-markierten monoklonale Antikörper wurden verwendet:

20 Als Marker für B-Lymphozyten Ratten-anti-Maus CD19 (Clone 1D3),

als Marker für Granulozyten, Makrophagen, Monozyten CD11  
(Clone M1/70),

25 als Marker für T-Lymphozyten Ratten anti-Maus CD3 (Clone 17A2),

und zur weiteren Differenzierung der T-Zellen:

30 CD4 (Clone GK1.5) als Marker für natürliche Killer T-Zellen und

CD8a (Clone 53-6.7) als Marker für zytotoxische T-Zellen.

35

Alle Antikörper wurden von BD Biosciences, Tullastrasse 8-12, 69126 Heidelberg, Deutschland bezogen. Die Färbungen mit den entsprechenden Antikörpern wurden vor der oben beschriebenen Erythrolyse durchgeführt. Dazu wurden je 10  $\mu$ l Antikörper in  
5 5 ml FACS-Röhrchen vorgelegt und 100  $\mu$ l Blut dazupipettiert, für 30 min bei RT abgedunkelt inkubiert, und nach der Erythrolyse eine 2-Farben-Fluoreszenzmessung durchgeführt (Anregungswellenlänge: 488 nm). Als Kontrolle wurde zusätzlich das Blut von zwei völlig unbehandelten GFP-Tieren analysiert. Die Werte der prozentualen GFP-Expression für jedes  
10 Einzeltier ergeben sich somit aus dem Mittelwert von 6 Einzelmessungen (eine 1-Farben-Fluoreszenzmessung ohne Färbung und je 5 2-Farben-Fluoreszenzmessungen mit Antikörperfärbung).

15

#### SDS-Gelelektrophorese:

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer Multi-gel-Long Elektrophoresekammer von Biometra mit einer denaturierenden, diskontinuierlichen 15% SDS-PAGE (Polyacrylamid  
20 Gelelektrophorese) nach Lämmli (Nature 277: 680-685, 1970). Dazu wurde zunächst ein Trenngel mit 1,5 mm Dicke gegossen: 7,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%, 0,9%), 3,8 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,4, 150  $\mu$ l 10% SDS, 3,3 ml Aqua bidest., 250  $\mu$ l  
25 Ammoniumpersulfat (10%), 9  $\mu$ l TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) und bis zum Auspolymerisieren mit 0,1% SDS überschichtet. Danach wurde das Sammelgel gegossen: 0,83  $\mu$ l Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0,9%), 630  $\mu$ l 1 M Tris/HCl, pH 6,8, 3,4 ml Aqua bidest., 50  $\mu$ l 10% SDS, 50  $\mu$ l 10% Ammoniumpersulfat,  
30 fat, 5  $\mu$ l TEMED.

Vor dem Auftrag auf das Gel wurde das Vollblut mittels Ultraschall aufgeschlossen, mit einer entsprechenden Menge an 4-fach Probenpuffer (200 mM Tris, pH 6,8, 4% SDS, 100 mM DTT  
35 (Dithiotreitol), 0,02% Bromphenolblau, 20% Glycerin) ver-

setzt, für 5 min im Heizblock bei 100°C denaturiert, nach dem Abkühlen auf Eis kurz abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Es wurden pro Bahn je 2 µl Vollblut eingesetzt. Der Lauf erfolgte wassergekühlt bei RT und einer konstanten elektrischen Spannung von 50 V. Als Längenstandard wurde der Proteingelmarker Kaleidoscope Prestained Standard der Firma Bio-Rad verwendet.

#### Western Blot:

- 10 Der Transfer der Proteine vom SDS-PAGE auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran (Hybond-P, Amersham) erfolgte im semi-dry Verfahren nach Kyhse-Anderson (J. Biochem. Biophys. Methods 10: 203-210, 1984) bei RT und einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA/cm<sup>2</sup> für 1,5 h. Als Transferpuffer wurde ein
- 15 Tris/Glycin-Puffer eingesetzt (39 mM Glycin, 46 mM Tris, 0,1 % SDS und 20% Methanol). Zum Überprüfen des elektrophoretischen Transfers wurden sowohl die Gele nach dem Blotten als auch die Blotmembranen nach der Immundetektion mit Coomassie (0,1% Coomassie G250, 45% Methanol, 10% Eisessig) gefärbt.
- 20 Zum Absättigen unspezifischer Bindungen wurde die Blotmembran nach dem Transfer in 1% Magermilchpulver/PBS für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde je dreimal je 3 min mit 0,1% Tween-20/PBS gewaschen. Alle nachfolgenden Antikörperinkubationen und Waschschr
- 25 tion mit dem Primärantikörper gegen GFP (polyklonaler Ziege anti-GFP-Antikörper, sc-5384, Santa Cruz Biotechnology) in einer Verdünnung von 1:2000 erfolgte für 1 h bei RT zusammen mit dem Aktinantikörper (polyklonaler Ziege-anti-Aktin-Antikörper, sc-1615, Santa Cruz Biotechnology) in einer Verdünnung von 1:1000. Danach wurde 3 x 5 min gewaschen und für 1 h
- 30 bei RT mit einem Sekundärantikörper (Esel anti-Ziege IgG, mit Meerrettich-Peroxidase markiert, Santa Cruz Biotechnology) in einer Verdünnung von 1: 10000 inkubiert. Die Detektion erfolgte mit dem ECL-System der Fa. Amersham nach den Angaben
- 35 des Herstellers.

Die Fig. 7, 8 und 10 zeigen die mittels FACS analysierte Inhibition der GFP-Expression in den Lymphozyten (Fig. 7 und 8) und im Vollblut mittels Western Blot-Analyse (Fig. 10) nach Injektion von spezifischer gegen GFP gerichtete dsRNA. Die in

5 Fig. 7 dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten der in Fig. 8 dargestellten Werte. Die Applikation von 25 µg GFP-spezifischer dsRNA pro kg Körpergewicht und Tag in der GFP-Gruppe führte somit im Vergleich zu der Kontrollgruppe, die während des Versuchs 250 µg einer unspezifischen Kontroll-

10 dsRNA pro kg Körpergewicht und Tag erhielt, zu einer signifikanten und spezifischen Reduktion der GFP-Expression. Die dsRNA-Konzentrationen lagen dabei deutlich unter den im ersten in vivo-Versuch verwendeten. Im ersten in vivo-Versuch waren die Injektionen über 10 Tage hinweg im 12 Stunden-

15 Rhythmus erfolgt, so dass sich eine Gesamttagesdosis von 5 mg dsRNA pro kg Körpergewicht ergab. Im Vergleich dazu betrug die Gesamttagesdosis im hier beschriebenen zweiten in vivo-Versuch 25 µg dsRNA pro kg Körpergewicht (die Injektionen erfolgten einmal täglich über 21 Tage hinweg). Diese Gesamttages-

20 gesdosis ist gegenüber dem ersten in vivo-Versuch 200-fach verringert. Die Gesamtdosis an dsRNA pro kg Körpergewicht über den gesamten Versuchszeitraum hinweg betrug im ersten in vivo-Versuch 50 mg pro kg Körpergewicht (2,5 mg/kg Körpergewicht x 20 Injektionen) um im zweiten in vivo-Versuch 0,525

25 mg pro kg Körpergewicht (25 µg/kg Körpergewicht x 21 Injektionen). Dies entspricht einer ca. 95-fach geringeren Menge an dsRNA. Die Reduktion der GFP-Expression im Blut ist jedoch in beiden Studien vergleichbar.

30 Fig. 9 zeigt, dass die Applikation der genannten dsRNAs über einen Zeitraum von 21 Tagen zu keiner Veränderung der Blutzusammensetzung führt. Die Reduktion der GFP-Expression in der mit GFP-spezifischer dsRNA behandelten Gruppe ist daher nicht auf eine Verringerung GFP-exprimierender Blutzellen zurückzu-

35 führen.



## Patentansprüche

1. Medikament zur Hemmung der Expression eines Zielgens, wobei das Medikament in mindestens einer Verabreichungseinheit vorliegt, welche eine zur Hemmung der Expression des Zielgens mittels RNA-Interferenz geeignete doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) in einer Menge enthält, welche eine Dosierung von höchstens 5 mg pro kg Körpergewicht und Tag ermöglicht.
2. Medikament nach Anspruch 1, wobei die Verabreichungseinheit die dsRNA in einer Menge enthält, welche eine Dosierung von höchstens 2,5 mg, insbesondere höchstens 200 µg, bevorzugt höchstens 100 µg, besonders bevorzugt höchstens 50 µg, insbesondere höchstens 25 µg, pro kg Körpergewicht und Tag ermöglicht.
3. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA in dem Medikament in einer Zubereitung enthalten ist, welche, insbesondere ausschließlich, aus einem physiologisch verträglichen Lösungsmittel und der darin gelösten dsRNA besteht.
4. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Lösungsmittel eine physiologische Kochsalzlösung oder ein physiologisch verträglicher Puffer, insbesondere eine phosphatgepufferte Salzlösung, ist.
5. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Kapsid, einem Kapsoid oder einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel umschlossen oder an einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel gebunden ist.
6. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Medikament eine Zubereitung aufweist, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion oder Injektion, insbesondere

dere zur intravenösen, intraperitonealen oder intratumoralen Infusion oder Injektion, geeignet ist.

7. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zum Zielgen zumindest abschnittsweise komplementären, insbesondere aus weniger als 25 aufeinander folgenden Nukleotiden bestehenden, Bereich aufweist.
8. Medikament nach Anspruch 7, wobei der komplementäre Bereich 19 bis 24, bevorzugt 20 bis 24, besonders bevorzugt 21 bis 23, insbesondere 22 oder 23, Nukleotide aufweist.
9. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Strang S1 weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, insbesondere 23, Nukleotide aufweist.
10. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zumindest ein Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.
11. Medikament nach Anspruch 10, wobei sich der einzelsträngige Überhang am 3'-Ende des Strangs S1 befindet.
12. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA nur an einem, insbesondere dem am 3'-Ende des Strangs S1 gelegenen, Ende einen einzelsträngigen Überhang aufweist.
13. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA neben dem Strang S1 einen Strang S2 aufweist.
14. Medikament nach Anspruch 13, wobei der Strang S1 eine Länge von 23 Nukleotiden, der Strang S2 eine Länge von 21 Nukleotiden und das 3'-Ende des Strangs S1 einen aus zwei Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang auf-

weist, während das am 5'-Ende des Strangs S1 gelegene Ende der dsRNA glatt ausgebildet ist.

15. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Strang S1 zum primären oder prozessierten RNA-  
5 Transkript des Zielgens komplementär ist.
16. Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) in einer Dosierung von höchstens 5 mg pro kg Körpergewicht und Tag zur Hemmung der Expression eines Zielgens mittels RNA-Interferenz in einem Säugetier oder Menschen.  
10
17. Verwendung nach Anspruch 16, wobei die dsRNA in einer Dosierung von höchstens 2,5 mg, insbesondere höchstens 200 µg, bevorzugt höchstens 100 µg, besonders bevorzugt höchstens 50 µg, insbesondere höchstens 25 µg, pro kg Körpergewicht und Tag verwendet wird.  
15
18. Verwendung nach Anspruch 16 oder 17, wobei die dsRNA in einer Zubereitung enthalten ist, welche, insbesondere ausschließlich, aus einem physiologisch verträglichen Lösungsmittel und der darin gelösten dsRNA besteht.
- 20 19. Verwendung nach Anspruch 18, wobei das Lösungsmittel eine physiologische Kochsalzlösung oder ein physiologisch verträglicher Puffer, insbesondere eine phosphatgepufferte Salzlösung, ist.
- 25 20. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 19, wobei die dsRNA von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Kapsid, einem Kapsoid oder einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel umschlossen oder an einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel gebunden ist.
- 30 21. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 20, wobei die dsRNA in einer Zubereitung vorliegt, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion oder Injektion, insbesondere

zur intravenösen, intraperitonealen oder intratumoralen Infusion oder Injektion, geeignet ist.

22. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 21, wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zum Zielgen zumindest abschnittsweise komplementären, insbesondere aus weniger als 25 aufeinander folgenden Nukleotiden bestehenden, Bereich aufweist.
23. Verwendung nach Anspruch 22, wobei der komplementäre Bereich 19 bis 24, bevorzugt 20 bis 24, besonders bevorzugt 21 bis 23, insbesondere 22 oder 23, Nukleotide aufweist.
24. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 23, wobei der Strang S1 weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, insbesondere 23, Nukleotide aufweist.
25. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 24, wobei zumindest ein Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.
26. Verwendung nach Anspruch 25, wobei sich der einzelsträngige Überhang am 3'-Ende des Strangs S1 befindet.
27. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 26, wobei die dsRNA nur an einem, insbesondere dem am 3'-Ende des Strangs S1 gelegenen, Ende einen einzelsträngigen Überhang aufweist.
28. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 27, wobei die dsRNA neben dem Strang S1 einen Strang S2 aufweist.
29. Verwendung nach Anspruch 28, wobei der Strang S1 eine Länge von 23 Nukleotiden, der Strang S2 eine Länge von 21 Nukleotiden und das 3'-Ende des Strangs S1 einen aus zwei Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang auf-

weist, während das am 5'-Ende des Strangs S1 gelegene Ende der dsRNA glatt ausgebildet ist.

30. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 29, wobei der Strang S1 zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.
- 5

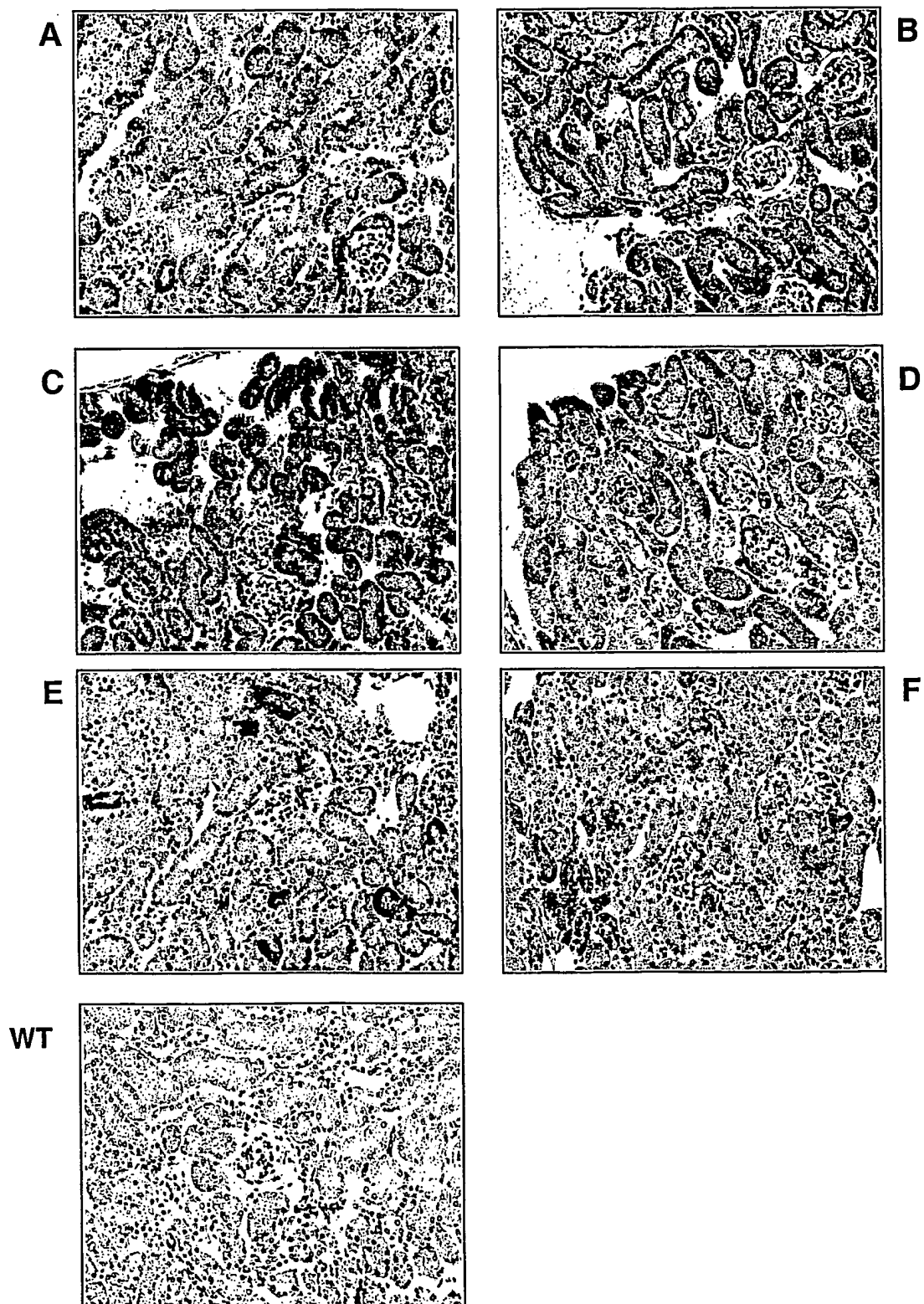


Fig. 1

2/9

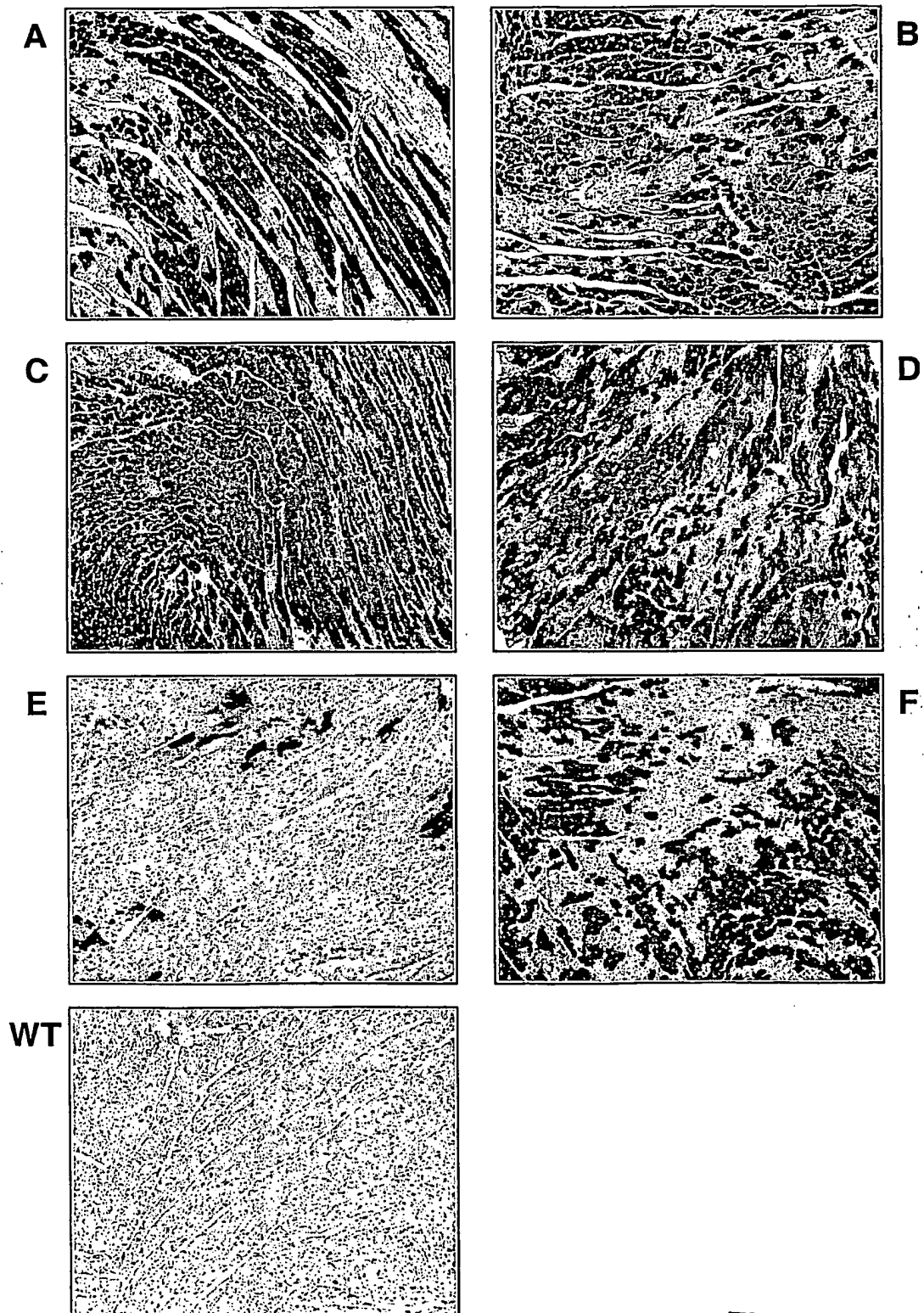


Fig. 2

3/9

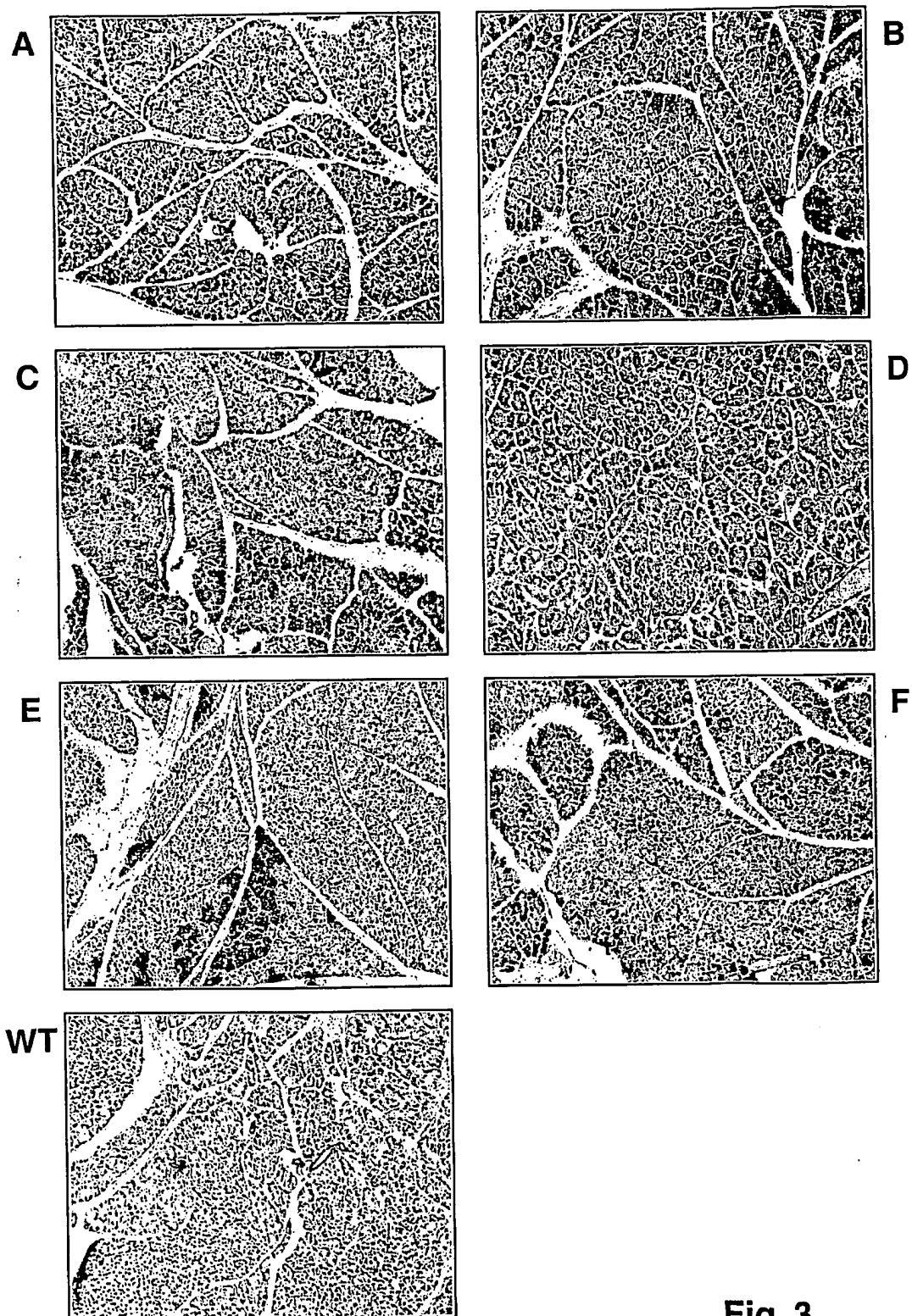
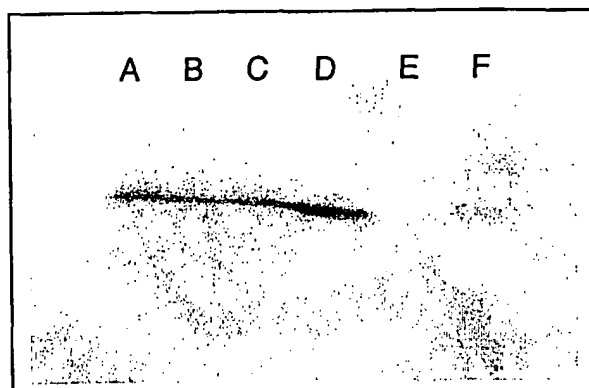


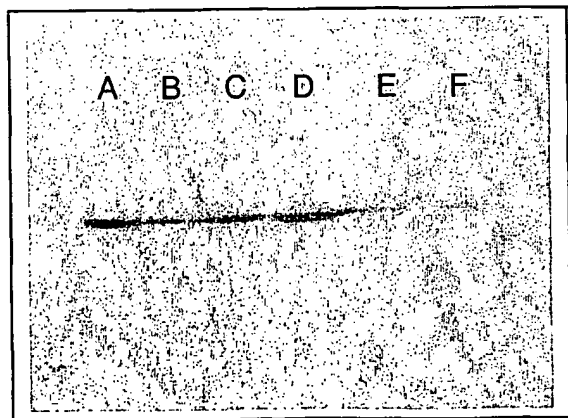
Fig. 3



4/9

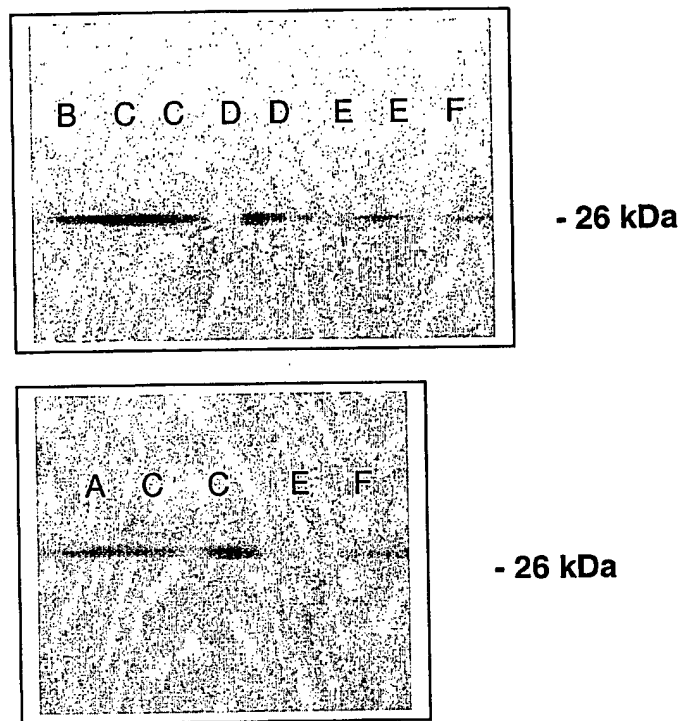


**Fig. 4**



**Fig. 5**

5/9



**Fig. 6**

6/9

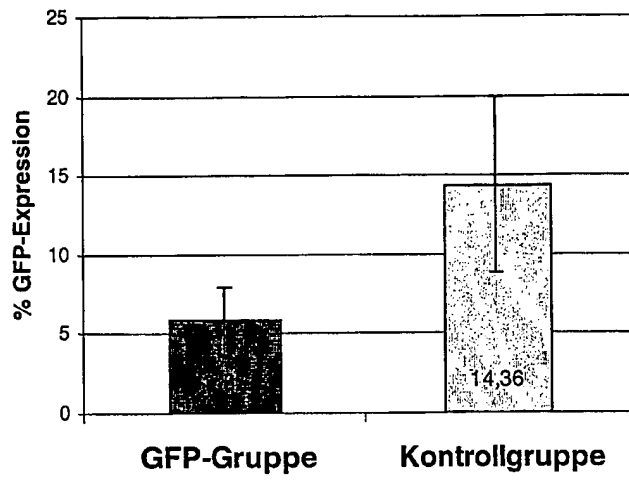


Fig. 7

7/9

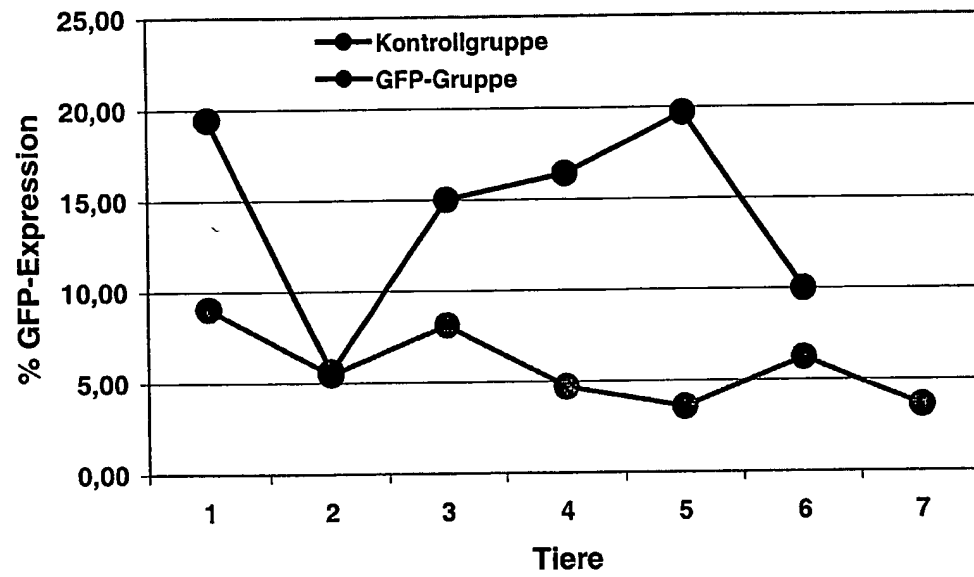


Fig. 8

8/9

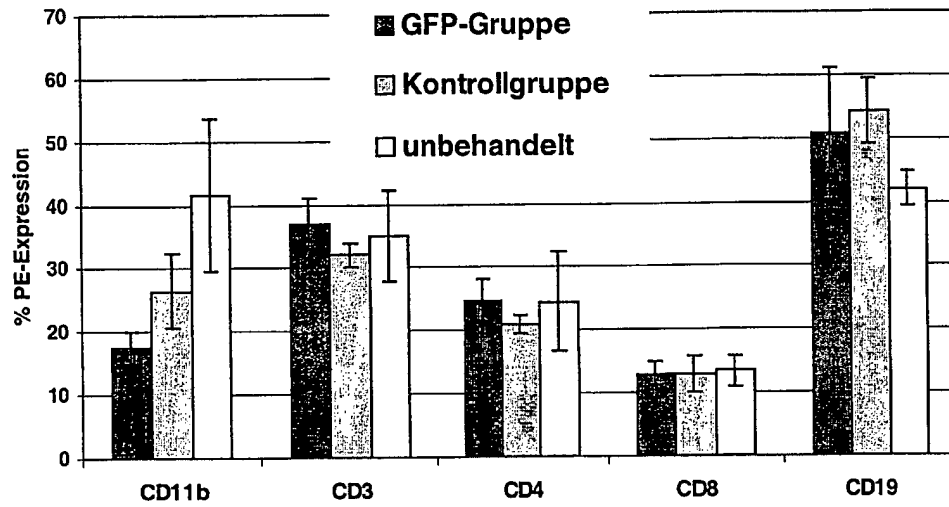


Fig. 9

9/9

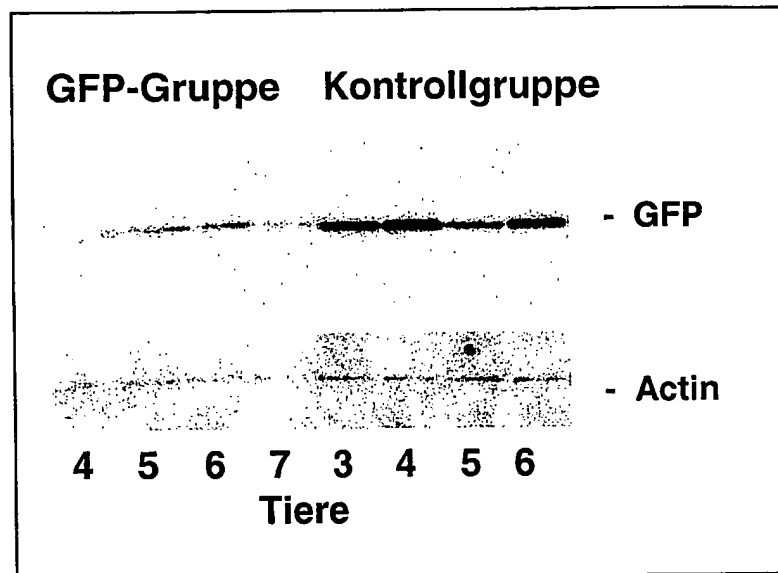


Fig. 10

I

## SEQUENZPROTOKOLL

5 <110> Ribopharma AG

10 <120> Medikament zur Hemmung der Expression eines Zielgens

<130> 422442EH

15

<160> 12

20

<170> PatentIn version 3.1

25 <210> 1

<211> 22

<212> RNA

30

<213> Künstliche Sequenz

35 <400> 1  
ccacaugaag cagcacgacu uc

22

40 <210> 2

<211> 22

<212> RNA

45 <213> Künstliche Sequenz

50 <400> 2  
gaagucgugc ugcuucaugu gg

22

<210> 3

55 <211> 21

<212> RNA

<213> Künstliche Sequenz

60

5	<400> 3 ccacaugaag cagcacgacu u	21
	<210> 4	
10	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> Künstliche Sequenz	
15		
	<400> 4 gucgugcugc uucauguggu c	21
20	<210> 5	
	<211> 22	
25	<212> RNA	
	<213> Künstliche Sequenz	
30		
	<400> 5 acaggagag gaucguuucg ca	22
35	<210> 6	
	<211> 22	
	<212> RNA	
40	<213> Künstliche Sequenz	
45		
	<400> 6 ugcgaaacga uccucauccu gu	22
50	<210> 7	
	<211> 21	
	<212> RNA	
55	<213> Künstliche Sequenz	
60		
	<400> 7 gaugaggau c guuucgcaug a	21



3

5      <210> 8  
      <211> 21  
      <212> RNA  
      <213> Künstliche Sequenz  
10  
      <400> 8  
      augcgaaacg auccucaucc-u 21  
15  
      <210> 9  
      <211> 21  
20      <212> RNA  
      <213> Künstliche Sequenz  
25  
      <400> 9  
      gaugaggauc guuucgcaug a 21  
30      <210> 10  
      <211> 23  
      <212> RNA  
35      <213> Künstliche Sequenz  
40      <400> 10  
      ucaugcgaaa cgauccucau ccu 23  
45      <210> 11  
      <211> 21  
      <212> RNA  
50      <213> Künstliche Sequenz  
55      <400> 11  
      ccacaugaag cagcacgacu u 21  
      <210> 12  
60      <211> 23

4

<212> RNA

<213> Künstliche Sequenz

5

<400> 12

aagucgugcu gcuucaugug guc

23

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 02/11971

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 A61K31/713 C12N15/11 C12N15/88		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, SEQUENCE SEARCH		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 32619 A (CARNEGIE INST OF WASHINGTON ;MONTGOMERY MARY K (US); FIRE ANDREW ( ) 1 July 1999 (1999-07-01) the whole document ---	1-6,13, 15-21, 28,30
X	WO 00 44895 A (KREUTZER ROLAND ;LIMMER STEPHAN (DE)) 3 August 2000 (2000-08-03) the whole document ---	1-6,13, 15-21, 28,30
X	WO 01 36646 A (EVANS MARTIN JOHN ;WIANNY FLORENCE (GB); CANCER RES CAMPAIGN TECHN) 25 May 2001 (2001-05-25) page 13 -page 18 ---	1-6,13, 15-21, 28,30
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'E' earlier document but published on or after the international filing date 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. 'Z' document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 3 March 2003		Date of mailing of the international search report 13/03/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Armandola, E

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internati Application No  
PCT/EP 02/11971

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 63364 A (AMERICAN HOME PROD ;PACHUK CATHERINE (US); SATISHCHANDRAN C (US)) 26 October 2000 (2000-10-26) page 24 -page 25 ----	1-6,13, 15-21, 28,30
X	ELBASHIR SAYDA M ET AL: "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs" GENES AND DEVELOPMENT, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, NEW YORK, US, vol. 15, no. 2, 15 January 2001 (2001-01-15), pages 188-200, XP002204651 ISSN: 0890-9369	1-6,13, 15-21, 28,30
Y	the whole document ----	7-12,14, 22-27,29
X	ELBASHIR SAYDA M ET AL: "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, vol. 411, no. 6836, 2001, pages 494-498, XP002206451 ISSN: 0028-0836	1-6,13, 15-21, 28,30
Y	the whole document ----	7-12,14, 22-27,29
X	WO 01 75164 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;TUSCHL THOMAS (DE); MASSACHUSETTS INST TE) 11 October 2001 (2001-10-11)	1-6,13, 15-21, 28,30
Y	the whole document ----	7-12, 14-22, 27,29
Y	BASS BRENDA L: "Double-stranded RNA as a template for gene silencing" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, NA, US, vol. 101, no. 3, 28 April 2000 (2000-04-28), pages 235-238, XP002194756 ISSN: 0092-8674 figure 1 ----	1-30
P,Y	WO 02 44321 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;TUSCHL THOMAS (DE); ELBASHIR SAYDA (DE);) 6 June 2002 (2002-06-06) the whole document ----	1-30
Y	WO 00 44914 A (FARRELL MICHAEL J ;LI YIN XIONG (US); KIRBY MARGARET L (US); MEDIC) 3 August 2000 (2000-08-03) the whole document ----	1-6,13, 15-21, 28,30
	----	

-/--

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internati      Application No  
PCT/EP 02/11971

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>CAPLEN N J ET AL: "Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems."            PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA.            UNITED STATES 14 AUG 2001,            vol. 98, no. 17,            14 August 2001 (2001-08-14), pages            9742-9747, XP002232936            ISSN: 0027-8424            the whole document</p> <p>-----</p>	1-30

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Internat Application No  
 PCT/EP 02/11971

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9932619 A	01-07-1999	US 6506559 B1	14-01-2003
		AU 743798 B2	07-02-2002
		AU 1938099 A	12-07-1999
		CA 2311999 A1	01-07-1999
		EP 1042462 A1	11-10-2000
		JP 2002516062 T	04-06-2002
		WO 9932619 A1	01-07-1999
WO 0044895 A	03-08-2000	DE 19956568 A1	17-08-2000
		AT 222953 T	15-09-2002
		AU 3271300 A	18-08-2000
		CA 2359180 A1	03-08-2000
		WO 0044895 A1	03-08-2000
		DE 10080167 D2	28-02-2002
		DE 50000414 D1	02-10-2002
		EP 1144623 A1	17-10-2001
		EP 1214945 A2	19-06-2002
		JP 2003502012 T	21-01-2003
WO 0136646 A	25-05-2001	AU 1406501 A	30-05-2001
		DE 1230375 T1	09-01-2003
		EP 1230375 A1	14-08-2002
		WO 0136646 A1	25-05-2001
		NO 20022359 A	18-07-2002
		US 2003027783 A1	06-02-2003
WO 0063364 A	26-10-2000	AU 4472100 A	02-11-2000
		BR 0009884 A	08-01-2002
		CN 1375004 T	16-10-2002
		EP 1171586 A2	16-01-2002
		JP 2002542263 T	10-12-2002
		WO 0063364 A2	26-10-2000
WO 0175164 A	11-10-2001	AU 3574402 A	11-06-2002
		AU 4962201 A	15-10-2001
		WO 0244321 A2	06-06-2002
		WO 0175164 A2	11-10-2001
		US 2002086356 A1	04-07-2002
WO 0244321 A	06-06-2002	AU 3574402 A	11-06-2002
		AU 4962201 A	15-10-2001
		WO 0244321 A2	06-06-2002
		WO 0175164 A2	11-10-2001
		US 2002086356 A1	04-07-2002
WO 0044914 A	03-08-2000	AU 2634800 A	18-08-2000
		CA 2361201 A1	03-08-2000
		EP 1147204 A1	24-10-2001
		WO 0044914 A1	03-08-2000
		US 2002114784 A1	22-08-2002

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internati is Aktenzeichen

PCT/EP 02/11971

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61K31/713 C12N15/11 C12N15/88

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, SEQUENCE SEARCH

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 99 32619 A (CARNEGIE INST OF WASHINGTON ;MONTGOMERY MARY K (US); FIRE ANDREW ( ) 1. Juli 1999 (1999-07-01) das ganze Dokument ---	1-6, 13, 15-21, 28, 30
X	WO 00 44895 A (KREUTZER ROLAND ;LIMMER STEPHAN (DE)) 3. August 2000 (2000-08-03)  das ganze Dokument ---	1-6, 13, 15-21, 28, 30
X	WO 01 36646 A (EVANS MARTIN JOHN ;WIANNY FLORENCE (GB); CANCER RES CAMPAIGN TECHN) 25. Mai 2001 (2001-05-25) Seite 13 -Seite 18 --- -/-	1-6, 13, 15-21, 28, 30



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

3. März 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

13/03/2003

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Armandola, E

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. s Aktenzeichen

PCT/EP 02/11971

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 00 63364 A (AMERICAN HOME PROD ;PACHUK CATHERINE (US); SATISHCHANDRAN C (US)) 26. Oktober 2000 (2000-10-26) Seite 24 -Seite 25 ---	1-6,13, 15-21, 28,30
X	ELBASHIR SAYDA M ET AL: "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs" GENES AND DEVELOPMENT, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, NEW YORK, US, Bd. 15, Nr. 2, 15. Januar 2001 (2001-01-15), Seiten 188-200, XP002204651 ISSN: 0890-9369	1-6,13, 15-21, 28,30
Y	das ganze Dokument	7-12,14, 22-27,29
X	ELBASHIR SAYDA M ET AL: "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, Bd. 411, Nr. 6836, 2001, Seiten 494-498, XP002206451 ISSN: 0028-0836	1-6,13, 15-21, 28,30
Y	das ganze Dokument	7-12,14, 22-27,29
X	WO 01 75164 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;TUSCHL THOMAS (DE); MASSACHUSETTS INST TE) 11. Oktober 2001 (2001-10-11)	1-6,13, 15-21, 28,30
Y	das ganze Dokument	7-12, 14-22, 27,29
Y	BASS BRENDA L: "Double-stranded RNA as a template for gene silencing" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, NA, US, Bd. 101, Nr. 3, 28. April 2000 (2000-04-28), Seiten 235-238, XP002194756 ISSN: 0092-8674 Abbildung 1 ---	1-30
P,Y	WO 02 44321 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;TUSCHL THOMAS (DE); ELBASHIR SAYDA (DE);) 6. Juni 2002 (2002-06-06) das ganze Dokument ---	1-30
Y	WO 00 44914 A (FARRELL MICHAEL J ;LI YIN XIONG (US); KIRBY MARGARET L (US); MEDIC) 3. August 2000 (2000-08-03) das ganze Dokument ---	1-6,13, 15-21, 28,30
-/-		



## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. Aktenzeichen

PCT/EP 02/11971

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
Y	<p>CAPLEN N J ET AL: "Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems."</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA.</p> <p>UNITED STATES 14 AUG 2001,</p> <p>Bd. 98, Nr. 17,</p> <p>14. August 2001 (2001-08-14), Seiten</p> <p>9742-9747, XP002232936</p> <p>ISSN: 0027-8424</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-30

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internatio : Aktenzeichen

PCT/EP 02/11971

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9932619 A	01-07-1999	US 6506559 B1	14-01-2003
		AU 743798 B2	07-02-2002
		AU 1938099 A	12-07-1999
		CA 2311999 A1	01-07-1999
		EP 1042462 A1	11-10-2000
		JP 2002516062 T	04-06-2002
		WO 9932619 A1	01-07-1999
WO 0044895 A	03-08-2000	DE 19956568 A1	17-08-2000
		AT 222953 T	15-09-2002
		AU 3271300 A	18-08-2000
		CA 2359180 A1	03-08-2000
		WO 0044895 A1	03-08-2000
		DE 10080167 D2	28-02-2002
		DE 50000414 D1	02-10-2002
		EP 1144623 A1	17-10-2001
		EP 1214945 A2	19-06-2002
		JP 2003502012 T	21-01-2003
WO 0136646 A	25-05-2001	AU 1406501 A	30-05-2001
		DE 1230375 T1	09-01-2003
		EP 1230375 A1	14-08-2002
		WO 0136646 A1	25-05-2001
		NO 20022359 A	18-07-2002
		US 2003027783 A1	06-02-2003
WO 0063364 A	26-10-2000	AU 4472100 A	02-11-2000
		BR 0009884 A	08-01-2002
		CN 1375004 T	16-10-2002
		EP 1171586 A2	16-01-2002
		JP 2002542263 T	10-12-2002
		WO 0063364 A2	26-10-2000
WO 0175164 A	11-10-2001	AU 3574402 A	11-06-2002
		AU 4962201 A	15-10-2001
		WO 0244321 A2	06-06-2002
		WO 0175164 A2	11-10-2001
		US 2002086356 A1	04-07-2002
WO 0244321 A	06-06-2002	AU 3574402 A	11-06-2002
		AU 4962201 A	15-10-2001
		WO 0244321 A2	06-06-2002
		WO 0175164 A2	11-10-2001
		US 2002086356 A1	04-07-2002
WO 0044914 A	03-08-2000	AU 2634800 A	18-08-2000
		CA 2361201 A1	03-08-2000
		EP 1147204 A1	24-10-2001
		WO 0044914 A1	03-08-2000
		US 2002114784 A1	22-08-2002